

헛개나무의 생리활성 탐색

이미경·김영길·안상욱·김민희·이진하·이현용*

Biological activities of *Hovenia dulcis* THUNB

Mi Kyoung Lee, Young Gil Kim, Sang Wook An, Min Hae Kim, Jin Ha Lee, and Hyeon Yong Lee*

ABSTRACT : Four different parts of *Hovenia dulcis* THUNB: fruit, bark, vessel area, fruit coat were extracted with water and ethanol. The ethanol extracts of bark, fruit coat and fruit were fractionized into diethyl ether, chloroform and aqueous partitions. Ethanol extract of fruit coat increased the activity of cathepsin B up to 55%, which can enhance the alcohol dehydration in the liver. The ethanol extracts was more effective than water extracts against the growth of Hep3B, MCF7. The ethanol extracts of bark (0.5mg/ml) inhibited 90% the growth of MCF7. Each extracts and fractions (0.5mg/ml) did not show considerable cytotoxicity on HEL299. In overall, most of the fractions had similar effects to ethanol extracts ; however, diethyl ether and chloroform fractions had higher bioactivity than ethanol extracts, but aqueous fraction.

Key words : *Hovenia dulcis* THUNB, cathepsin B, anti-cancer, GST

서 언

천연물질에서 생리활성 물질을 찾는 연구는 오랜 시간 동안 여러 연구자들에 의해 이루어 졌으며 질병에 대한 치료제 및 예방책 또는 건강보조제로서 식물을 널리 이용 하였다. 또한 경제성장의 발달과 국민소득의 증대로 건강식품 및 무공해 식품에 대한 국민들의 관심도의 급증과 약용 식물에 대한 향암 및 여러 생리활성 기능이 밝혀짐에 따라 이들 추출 정제하여 기능성 식품 및 신의약품으로서의 개발에 대한 연구가 많은 관심을 가져 오고 있

다 (Rubin, 1985 ; Aeschbacher, 1980).

헛개나무 (*Hovenia dulcis* THUNB)는 갈매나무과의 고목으로 일명 지구자나무 및 괴조 (拐棗)라고도 한다. 높이는 10-17m 이고 수피는 흑회색이며, 열매는 갈색이 돌고 지름 8mm정도이며 닭의 발톱모양이다. 열매는 은은한 향기가 있고, 단맛이 있어 먹을 수 있으며 음식의 맛을 돋군다. 본초강목에 술을 썩히는 작용이 있다고 하며, 생즙은 술독을 풀고 구역질을 멎게 한다고 하였다. 전통적으로 종자 (種子)는 주정중독 (酒精中毒), 소변불리 (小便不利), 구토 (嘔吐)에, 과경 (果梗)은 건위 (健胃), 자양보혈 (滋養補血)에 효과가 있다고 전해진다

* 강원대학교 농업생명과학대학 (College of Agriculture & Life Science, Kangwon National University, Chunchon 200 - 701, Korea)

< '99. 7. 16 접수 >

(두산 세계 대백과사전 105 1989). 최근에 이 헛개 나무에 대한 여러 연구들이 진행되고 있는데 주로 일본에서 이루어지며, 단맛을 이용한 감미료로서의 이용 가능성과 항알러지의 이용 가능성을 검색하여 기능성 소재로서의 활용을 꾀하고 있다. (Yoshikawa, et al, 1995 ; Yoshikawa, 1996 ; Yoshikawa, 1992 ; Yoshikawa, 1997). 그러나 국내에 있어서 헛개나무의 생리활성에 대한 심층적인 연구는 거의 없는 실정이며, 식품으로의 이용되고 있는 부위도 열매와 잎부분으로 한정되어 있다.

따라서 본 논문은 강원도 양양산 헛개나무의 수피, 목부, 열매, 열매껍질의 각 추출물에 대한 부위별 생리활성의 검색을 목적으로하여 간기능의 중요 지표 중의 하나인 glutathione-S-transferase의 활성을 측정하여 독소 해독 작용을 측정 하였고, cathepsin을 이용한 숙취 해소 작용을 검색하며, 암세포에 대한 항암활성 및 세포독성을 검색하고자 하고, 수피부와 목부에 대한 식용 및 기능성 식품 소재로서의 활용도를 모색하고자 하였다. 또한 실험 결과 생리활성이 높게 나타난 수피, 열매, 열매 껍질부의 에탄올 추출물에 대해 유기 용매 분획분의 생리활성을 측정하여 유효성분의 분포를 측정하였다.

재료 및 방법

1) 시료 제조

헛개나무는 수피, 목부, 열매부, 열매 껍질부로 나누어 채취한 뒤 깨끗이 손질하여 추출에 적합하도록 처리하여, 수직으로 환류 냉각기를 부착시킨 flask에 시료 중량에 대해 각각 10배의 증류수와 ethanol로 6시간 동안 2회 열탕 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들은 뜨거운 상태에서 감압 여과 장치에서 여과, 농축 후 동결 건조한 뒤 각각의 수율을 계산하였다.

수피부와 열매부, 열매 껍질부의 각 추출물들에 에탄올에 용해시킨 뒤 에탄올 용해물, 물, diethylether를 1 : 9 : 10의 비율로 혼합하여 분획 여두에서 분획하는 과정을 3회 반복한 후, 감압 농축하여 diethylether 분획을 얻었다. 또한 그 잔여물을 다시 chloroform으로 3회 반복 분획하였으며, 마지막 잔여물을 수층으로 하였다.

2) 간기능 관련 생리 활성 측정

• 해독작용 - Glutathione S-transferase 측정

헛개나무의 해독작용의 정도를 측정하기 위하여 간의 중요 해독기전 중의 하나인 GST (glutathione-S-transferase)의 활성을 측정하였다. Mohn (1981)의 방법과 같이 조제된 반응시약에 대조구로 추출물이 제외된 반응액을 대조구로 하였으며, 각 추출물을 농도별로 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 기질로서 1-chloro-2, 4dinitrobenzene을 첨가한 후 다시 37℃에서 2분간 반응시켰다. 반응 후 20% TCA를 가하여 반응을 종결시키고 원심분리한 후 상등액을 340nm에서 흡광도를 측정 한 뒤 다음과 같이 GST의 활성도를 계산하였다.

$$\text{Total activity (units)} = A_{340}/9.6 \times \text{회석배수} \times 3\text{ml} / 0.1 \times \text{crude extract (ml)}$$

$$\text{Specific activity (units/mg protein)} = \text{total activity} / \text{total protein}$$

$$\text{활성율 (\%)} = \text{specific activity}_{\text{test}} / \text{specific activity}_{\text{control}} \times 100$$

• 숙취해소

헛개나무 추출물의 알콜 대사 촉진 기능을 검색하기 위하여 cathepsin-B의 aminomethylcoumarin 분해능을 측정 하였다. 1 milliunit의 cathepsin-B에 각 헛개나무 추출물을 1μg/100μl의 농도로 첨가하고 aminomethylcoumarin을 1분간 분해 시킨 뒤 340 nm에서 흡광도를 측정하여 대사촉진을 측정하였다.

3) 항암 활성 측정

• 세포주 및 생육배지

실험에 이용한 세포주는 Hep3B (hepatocellular carcinoma human), MCF7 (breast adenocarcinoma, pleural effusion, human), HEL299 (normal lung, human)을 사용하였으며 Hep3B, MCF7은 DMEM 배지로 HEL299는 RPMI-1640 배지에서 10% fetal bovin serum으로 적응 시켜 실험에 사용하였다.

• 항암 활성 측정

Hep3B와 MCF7은 세포 단백질을 염색하여 세포의 증식이나 독성을 측정하는 SRB (sulforhodamine B) 방법으로 항암 효과를 측정하였다. (Doyle et al., 1993 ; Dool et al., 1981).

• 세포 독성 측정

헛개나무 추출물 및 분획물의 정상세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 HEL299 세포를 이용, SRB 방법으로 세포독성을 측정하였다.

4) 헛개나무 분획물들의 생리활성 측정

• 헛개나무 에탄올 추출물들의 분획

헛개나무 추출물 중 수피, 열매, 열매껍질의 에탄올 추출물들의 생리활성 부분을 분리 정제하기 위하여 극성 차를 이용하여 diethyl ether, chloroform 및 증류수 층으로 분획하였다. 각 분획물들의 생리활성은 이전의 시료들과 마찬가지로 간기능 검색, 항암활성을 동일한 실험 방법으로 수행 하였다.

결과 및 고찰

1. 헛개나무의 추출 및 분획 수율

헛개나무의 수피, 목부, 열매, 열매껍질의 증류수 및 에탄올 추출물의 수율은 Table 1. 과 같다. 각 부위에 있어서 증류수 추출물이 에탄올 추출물보다 2-3배정도 높은 수율을 보였으며, 수피부와 목부에 비하여 열매부와 열매 껍질부의 수율이 상대적으로 높았다. 추출물의 정제 및 분리를 위한 수피, 열매, 열매껍질의 에탄올 추출물의 diethyl ether, chloroform 및 증류수 층의 분획에서는 나타낸 바와 같이 각 추출물에서 증류수 층의 수율이 가장 높았고 diethyl ether층이 가장 적게 얻어졌다. 열매의 경우 chloroform층과 마지막 3회 분획시 분리가 일어나지 않아 chloroform층은 2회 분획물만을 얻었고 증류수 층은 실험에서 제외되어졌다. 분획의 결과, 헛개나무 각 부위의 에탄올 추출물은 극성이 높은 화합물을 더 많이 함유하고 있다고 사료되어진다.

2. 간 기능 활성

GST 활성 검색을 통한 간 기능 및 간 해독 작용의 검색결과는 에탄올 추출물들이 물 추출물들에 비하여 70-80%이상 높은 해독활성을 보였으며 (Fig. 1), 분획물의 GST활성을 측정한 결과 열매

Table 1. The extraction and fractions yields of *Hovenia dulcis* THUNB according to extracts solvents : water and ethanol.

Samples	Solvents	Yeilds (%)
Bark	water	13.945
	ethanol	7.3701
	diethyl ether Fr.	1.59
	chloroform Fr.	12.71
Vessel area	water Fr	40.18
	water	5.1035
	ethanol	3.6979
Fruit coat	water	27.2568
	ethanol	16.4264
	diethyl ether Fr.	2.68
	chloroform Fr.	17.44
	water Fr.	54.87
	Fruit	water
	ethanol	15.61
	diethyl ether Fr.	2.62
	chloroformFr.	12.61

와 열매껍질의 diethyl ether 분획과 chloroform 분획에서 약 1.2-1.5배 정도의 해독 작용의 증가를 나타내었다 (Fig. 2). Cathepsin-B를 이용한 알콜 대사 기능 측진을 측정하여 숙취 해소에 있어서의 헛개나무 추출물의 촉진효과를 측정한 결과, 헛개나무 추출물을 첨가 시 40-50%이상의 빠른 촉진결과를 나타내었다 (Fig. 3). 열매부 및 열매 껍질부의 대사촉진 기능이 수피부 및 목질부에 비하여 높았다. 이러한 효과는 헛개나무의 성분이 주로 간장의 해독 기능을 증진시키며 알콜 대사 물질의 체내 분해를 촉진시키며, 나아가 숙취의 주된 현상인 두통의 원인이 되는 aldehyde 물질의 잔류를 억제 하리라 사료된다.

3. 항암 활성

헛개나무의 각 추출물 및 분획물의 인간 간암세포주 (hep-3B), 인간 유방암 세포주 (MCF-7)에 대한 항암활성의 검색 결과 전체적으로 에탄올 추출

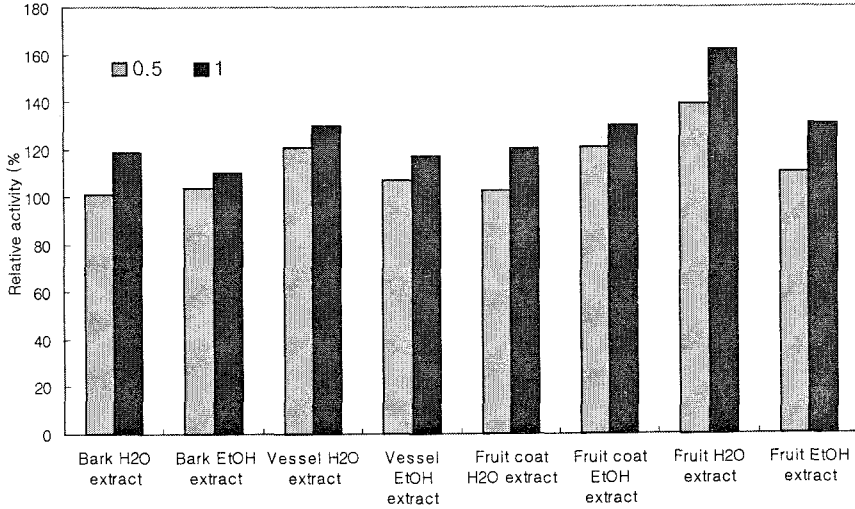


Fig. 1. Relative specific activity of GST of the crude extracts from *Hovenia dulcis* T_{HUNB}.

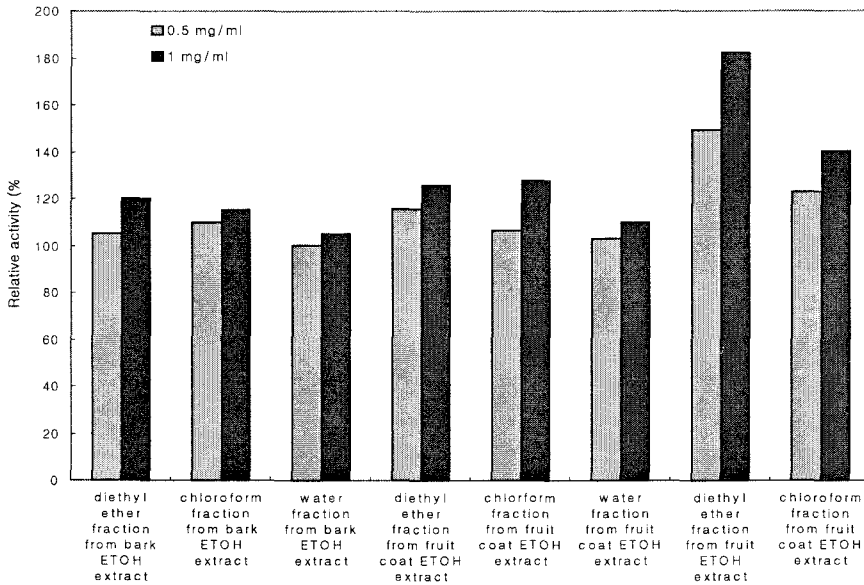


Fig. 2. The enhancement of GST activity of the fractions from *Hovenia dulcis* T_{HUNB} ethanol extracts.

물이 높은 항암효과를 갖고 있는 것으로 나타났다 (Table 2, 3). 인간 간암세포에 대한 억제 활성은 수피의 물 추출물과 열매 껍질부분 등에서 공히 60% 이상의 항암활성을 보였다. 수피의 에탄올 유방암 세포주에 대해서는 암세포 생육억제 활성이

더 높아 수피의 에탄올 추출물이 0.5g/L이상의 농도에서 90%이상의 가장 높은 항암 활성을 보였다. 분획물의 경우 MCF-7에 대하여 0.5mg/ml의 농도에서 80%이상의 높은 암세포 억제율을 나타내었고, 열매껍질의 chloroform 분획물은 최고농도에

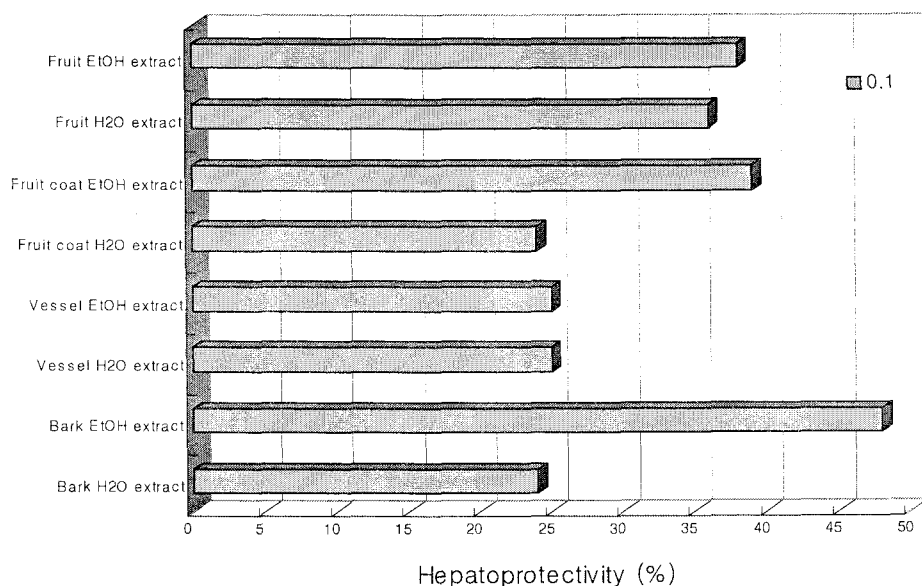


Fig. 3. Hepatoprotective activity of the crude extracts from *Hovenia dulcis* THUNB (0.1 mg/ml) by alcohol related damages.

Table 2. Anticancer effects of the extracts from *Hovenia dulcis* THUNB on Hep3B (hepatocellular carcinoma human)

Sample	Extracts	Sample concentrate (mg/ml)				
		0.05	0.1	0.25	0.5	1
Bark	H ₂ O extract	24.63	29.2	32.84	39.73	45.53
	EtOH extract	22.01	29.52	33.57	36.64	58.32
	diethyl ether fraction	45.32	50.02	61.03	67.49	70.32
	chloroform fraction	12.34	32.09	65.83	67.9	69.04
	water fraction	10.52	16.94	21.04	31.25	55.32
Vessel area	H ₂ O extract	25.43	33.27	35.15	39.37	42.45
	EtOH extract	26.3	29.09	38.75	42.19	45.19
Fruit coat	H ₂ O extract	19.72	37.79	39.85	42.71	50.62
	EtOH extract	19.04	22.41	49.8	50.09	54.97
	diethyl ether fraction	9.02	30.33	42.94	51	62.12
	chlorform fraction	12.32	25.66	53.27	61.85	70.93
	water fraction	21.21	29	35.24	39.08	43.2
Fruit	H ₂ O extract	26.55	28	29.52	39.5	42.1
	EtOH extract	33.89	40.21	49.32	50.81	55.39
	diethyl ether fraction	30.45	43.53	49	54.32	59.27
	chloroform fraction	19.06	23.46	45.32	62.33	71.32

Table 3. Anticancer effects and selectivity of the extracts from *Hovenia dulcis* T_{HUNB} on MCF-7 (breast adenocarcinoma, pleural effusion, human).

Sample	Extracts	Sample concentrate (mg/ml)									
		0.05		0.1		0.25		0.5		1	
		Inhibition (%)	selectivity	Inhibition (%)	selectivity	Inhibition (%)	selectivity	Inhibition (%)	selectivity	Inhibition (%)	selectivity
Bark	H ₂ O extract	78.05	7.3	80.81	6.5	86.23	6.3	87.55	4.6	89.25	4.1
	EtOH extract	59.06	9.7	75.32	11.2	82.28	4.6	93.25	3.8	93.89	2.3
	diethyl ether fraction	59.8	6.0	62.33	5.8	69.34	5.8	81.02	5.9	89	4.5
	chloroform fraction	63.49	5.9	69.92	5.8	80.42	4.5	90.09	4.3	92.22	2.6
	water fraction	45.23	10.3	50.36	8.0	58.33	5.0	63.23	4.4	70.33	3.6
Vessel area	H ₂ O extract	80.19	10.8	82.67	8.3	83.76	5.2	90.09	5.2	92.59	4.7
	EtOH extract	78.7	14.2	82.44	11.2	88.61	7.8	92.62	5.3	94.46	4.4
Fruit coat	H ₂ O extract	82.72	8.4	82.99	7.6	83.56	5.1	89.08	5.2	90.19	5.2
	EtOH extract	80.43	11.8	83.54	9.4	85.5	5.9	91.1	5.5	93.2	4.8
	diethyl ether fraction	70.32	10.2	73.75	8.4	74.24	5.9	79.03	4.0	85.31	4.0
	chloroform fraction	73.24	8.4	76.43	7.0	81.29	7.0	86.71	6.5	91.03	5.3
	water fraction	39.02	7.7	51.22	6.7	68.53	6.9	77.6	5.4	81.02	4.1
Fruit	H ₂ O extract	83.79	10.7	85.78	10.6	87.43	7.0	91.89	6.5	92.18	5.7
	EtOH extract	81.81	11.6	82.06	8.3	83.67	5.1	90.16	5.0	92.97	5.1
	diethyl ether fraction	55.3	5.6	59.75	5.2	60.36	4.4	83.19	5.5	86.83	5.4
	chloroform fraction	59.01	5.6	65.85	5.2	67.68	4.2	80.47	4.5	82.27	4.5

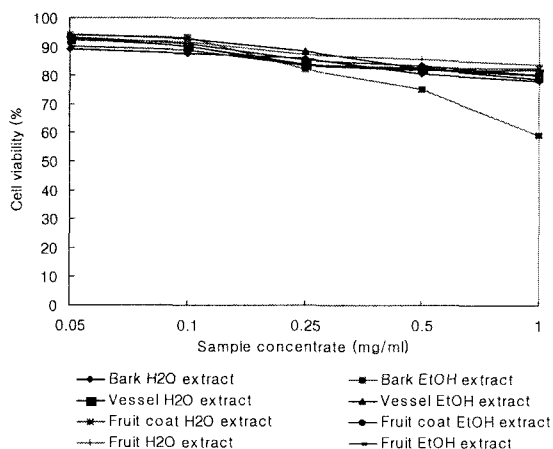


Fig. 4. Cell viability of the crude extracts from *Hovenia dulcis* T_{HUNB} on HEL299 (Human normal lung cell).

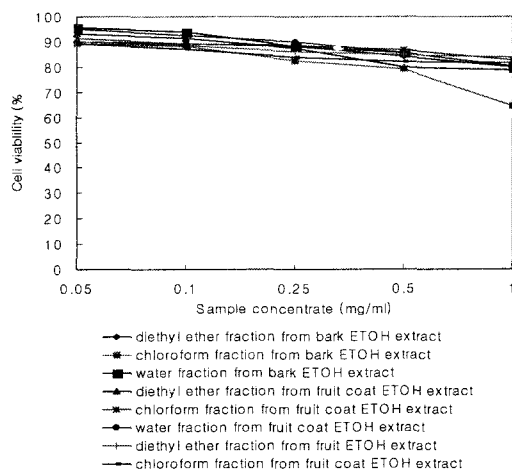


Fig. 5. Cell viability of the fractions from *Hovenia dulcis* T_{HUNB} extracts on HEL299 (Human normal lung cell).

서 91%의 억제율을 나타내었다. Hep3B에 대해서는 수피의 diethyl ether 분획과 chloroform분획이 0.25mg/ml의 농도 이상에서 60%이상의 높은 억제율을 나타내었고 열매 및 열매 껍질부에서는 chloroform분획에서 추출물보다 상승된 억제율을 나타내었다. 또한 헛개나무의 각 부위별 추출물들 및 분획물은 정상세포에 대하여 0.5g/L 이하의 농도로 투여 시는 정상세포 생존율을 70%이상으로 유지시켜 그다지 독성을 미치지 않으나 1g/L의 농도의 경우 높은 농도로 인해 세포가 영향을 입어 60% 내외의 생존율을 나타내었다 (Fig. 4, 5). 따라서 이 물질들의 투여시 한계농도는 0.5g/L로 사료되며 이 농도에서는 암 세포만을 선택적으로 죽이는 항암 선택성을 갖고 있는 것으로 유추된다. 또한 유방암 세포주의 경우 암 세포 선택 사멸도가 각 시료와 농도에서 3이상을 나타내었다 (Table 3). 간암 세포의 IC50은, 부위별 추출물과 분획물의 비교 시, 수피 에탄올 추출물은 0.8mg/ml에서 diethyl ether 분획물은 0.1mg/ml의 농도로 감소하였고, 열매 에탄올 추출물은 0.5mg/ml에서 0.28mg/ml의 농도로 감소하였다.

이 같은 실험 결과들을 미루어 헛개 나무 추출물 중 에탄올 추출물이 상당히 높은 활성이 있는 것으로 입증되었으며 이를 이용한 기능성 식품 개발 시 그 유용 가치는 매우 높을 것이다. 이와 함께 생리 활성 물질의 극성 분포의 확인을 위한 TLC (Thin Layer Chromatography) 에 의한 심층 분석 중에 있으며, 기초 결과로는 수피의 에탄올 추출물 및 분획물의 경우 주요 spot과 열매 및 열매 껍질의 추출물 및 분획물들 spot이 유의적으로 상이한 위치에 있는 것이 나타났다. 따라서 수피와 열매 및 열매 껍질부의 활성물질은 다른 종류의 극성을 가지는 상이한 종류의 화합물질로 추측되어지며, 열매와 열매 껍질의 생리활성물질은 비슷한 종류의 화합물질로 추측되어진다. 이 같은 활성 물질들의 명확한 정제 분리 및 구조의 규명에 대한 연구를 수행 중에 있다. 이 결과를 활용한 새로운 식품 제조 및 응용에 관한 연구가 요구된다.

적 요

강원도 양양에 자생하는 헛개나무의 증류수 및

에탄올 추출물의 간 기능 및 항암 활성에 대한 생리 활성을 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

헛개나무 추출물의 간 기능 및 간 해독작용의 검색 결과 에탄올 추출물들이 물 추출물들에 비하여 높은 해독작용을 나타내었으며, Cathepsin B를 이용한 알콜 대사 기능의 측정에서 헛개나무 열매껍질의 경우 알콜만 먹인 쥐에 비해 40-50%이상 빠른 대사 촉진을 나타냈다.

각 추출물의 항암활성은 전체적으로 에탄올 추출물이 증류수 추출물에 비하여 높은 항암 활성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 유방암 세포주에 대해 수피의 에탄올 추출물의 경우 0.5mg/ml의 농도에서 90%이상의 가장 높은 항암 활성을 나타내었다. 헛개나무 추출물들 및 분획물은 정상 세포에 대해 0.5mg/ml 이하의 농도로 투여 시는 세포 생존율이 70%이상으로 유지시키며, 이농도에서는 암세포만을 선택적으로 사멸시키는 선택성을 갖는 것으로 사료 되어진다. 헛개나무 에탄올 추출물의 각 분획물은 각각의 생리활성을 검색에서 추출물과 유사한 결과를 나타내며 diethyl ether층과 chloroform 층의 경우 활성이 상승되기도 하였으나, 물 분획층의 경우 추출물보다 낮은 효과를 보이기도 하였다.

감사의 글

본 연구는 양양 농업기술센터와 강원도식품산업 기술센터의 지원으로 이루어진 결과로, 이에 심심한 사의를 표합니다.

LITERATURE CITED

- Rubin, H. 1985. Cancer as a dynamic development disorder, *Cancer Res.* 45 : 2935.
- Aeschbacher, H. V. and H. P. Wurzner. 1980. An evaluation of constant and regular coffee in the Ames mutagenicity test. *Toxicol Lett.* 5 : 139.
- Kennedy, L. M., L. R. Saul, R. SefECKa, and D. A. Stevens. 1988. Hodulcin : Selective sweetness-reducing principle from *Hovenia dulcis* leaves. *Chem. Senses.* 13, 4 : 529-543.
- Yoshikawa, M., T. Ueda, O. Muraoka, H. Aoyama,

- H. Matsuda, H. Shimoda, J. Yamahara, and N. Murakami. 1995. Absolute stereostructures of Hovenidulciosides A₁ and A₂, Bioactive novel triterpene glycoside from *Hoveniae semen seu fructus*, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* 43 (3) : 532-534.
- Yoshikawa, M., T. Murakami, T. Ueda, H. Matsuda, J. Yamahara, and N. Murakami. 1996. Bioactive Saponins and glycosides. IV. four methylmigrates 16,17-*seco*- dammarane triterpene glycosides from chinese natural medicine, *Hoveniae semen seu fructus*, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB. : Absolute stereostructures and inhibitory activity on histamine release of hovenidulciosides A₁, A₂, B₁, and B₂. *Chem. Pharm. Bull.* 44 (9) : 1736-1743.
- Yoshikawa, K., S. Tumura, K. Yamada, and A. Shigenobu. 1992. Antisweet natural products. VII. Houlосides I, II, III, IV, and V from the leaves of *Hovenia dulcis* THUNB. *Chem. Pharm. Bull.* 40 (9) : 2287-2291.
- Yoshikawa, M., T. Murakami, T. Ueda, S. Yosizumi, K. Ninomiya, N. Murakami, H. Matsuda, M. Saito, W. Fuji, T. Tanaka, and J. Yamahara. 1997. Bioactive constituents of Chinese natural medicines III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, Hovenitins I, II, and III, isolated from *Hoveniae semen seu fructus*, the seeds and fruit of *Hovenia dulcis* THUNB. (Rhamnaceae) : Inhibitory effect on Alcohol-Induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi* 117 (2) : 108-118.
- Mohn, G. R. 1981. ICPEMC working paper 2/7, Bacterial system for carcinogenicity testing, *Mutat. Res.* 87 : 191.
- Doyle, A., J. B. Griffiths, and D. G. Newell, 1993. Cell & Tissue culture : Laboratory procedures., Wiley.
- Dool, R. and R. Peto, 1981. The causes of cancer : Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66(6), 1192.
- 김필홍. 두산 세계 대백과사전. 1989. 28 : 105.